การโคลนยีน/ส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของข้าว

Cloning of Brown Plant Hopper Resistance Genes in Rice

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ประสาน สืบสุข สาธิต ทยาพัชร[1]

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stal) are the most important rice insect pest. There have been a large number of reports that the insect causes a big damage of rice crop in every Asian country. Brown plant hopper live on sucking rice plant sap and they are carrier of ragged stunt virus that can cause a tremendous reduction of rice yield. In 1990, about 1.5-1.8 million tons of yield of dry season rice crop were damaged by brown plant hopper. Rice variety improvement for the insect resistant by cross breeding incorporating with Marker Aided Selection application is one of problem solution; and cloning of insect resistant genes in rice to make use in breeding program is another hope. In gene cloning, high step of bio-molecular technique namely SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) were applied to study gene expression of the whole genome to use in analysis and search for brown plant hopper resistant genes in rice and eventually genes can be cloned. The process began with stimulation of brown plant hopper resistant genes in Suphanburi 90 variety seedlings to activate gene expression by feeding the rice seedlings to the insect for 0, 1 and 2 days. mRNA of the three treated seedlings was extracted. mRNA was changed to cDNA and thereafter cDNA fiber was cut by *Nla*III enzyme. Samples were divided into 2 plants, each of which was connected by different linkers. DNA fiber was cut again by *Bsms*I enzyme and order of cDNA which was Tag of shot genes of 10 - 14 base. Connected to the linker was obtained. Tag were separated

รหัสกิจกรรม 05-01-47-02

รหัสการทดลอง 05-01-47-0201

[1]ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

and they were connected to the length of 500-800 base and spliced to plasmid to increase volume in *E. coli* and finally genetic order was read by ABI3700 DNA Analyzer. SAGE 2000 program was used to identify order and number of Tag.

It was found that there were expression of 13,624, 16,254 and 10,404 gene groups in 1 day, 2 days and control treatments, respectively. In this number of genes, there were 4,662 different gene groups. When using Blast program to examine type of genes in information base, all of 4,662 genes were found. However, only 2,489 genes were known and 2,173 genes were unknown. When the rice plants were stimulated by brown plant hopper, there were 40 up regulated genes and 16 down regulated genes, and they were mostly involved in stress and some of them were anticipated brown plant hopper resistant. Information of these genes were taken for primer design and expression confirmation, and information for cloning gene anticipated to be brown plant hopper resistant. Gene cassette was prepared for further testing.

บทคัดย่อ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stal) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญที่สุด มีรายงานว่าทำให้เกิดความเสียหายกับข้าวปลูกของทุกประเทศในแถบเอเชีย โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว และเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคจู๋ที่ทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงอย่างมาก ปี 2533 ผลผลผลิตข้าวนาปรังของไทย ได้รับความเสียหายจากการทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลถึง 1.5 - 1.8 ล้านตัน การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโดยวิธีการผสมพันธุ์ร่วมกับการใช้ Marker Aided Selection เป็นวิธีการหนึ่งในการแก้ปัญหา การโคลนยีนต้านทานในข้าวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นอีกความหวังหนึ่ง งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลขั้นสูงที่เรียกว่า SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนทั้งจีโนมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์และค้นหายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว เพื่อนำไปสู่การโคลนยีนดังกล่าว เริ่มด้วยการนำต้นกล้าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ไปกระตุ้นยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลให้มีการแสดงออก โดยนำข้าวพันธุ์นี้ไปให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดูดกิน 1 และ 2 วัน เปรียบเทียบกับที่ไม่ได้รับการดูดกิน สกัดแยก mRNA ของข้าวทั้ง 3 ชุด เปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA แล้วตัดสาย cDNA ด้วยเอ็นไซม์ *Nla* III แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนเชื่อมต่อด้วย Linker ที่ต่างกัน ตัดสาย DNA นี้ด้วยเอ็นไซม์ *Bsmf* I อีกครั้งจะได้ลำดับของ cDNA ส่วนที่เป็น Taq ที่เป็นส่วนของยีนสั้นๆขนาด 10-14 เบส เชื่อมต่ออยู่กับ Linker แยกส่วนของ Taq มา

เชื่อมต่อกันให้ยาว 500 – 800 เบส ตามลำดับ ตัดต่อ Taq ที่เชื่อมเป็นสายยาวเข้ากับplasmid เพื่อเพิ่มปริมาณใน *E. coli* และนำไปอ่านลำดับพันธุกรรมทั้งหมดด้วยเครื่อง ABI 3700 DNA Analyser จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SAGE 2000 เพื่อแยกลำดับและจำนวนของ Taq ผลการทดลองตรวจพบการแสดงออกของยีนในต้นข้าวที่ถูกแมลงดูดกิน 1 วัน และ 2 วัน และที่ไม่ได้ถูกดูดกิน รวมทั้งสิ้น 13,624, 16,254 และ 10,404 ชุดของยีน ตามลำดับ ในจำนวนนี้เมื่อวิเคราะห์แล้วเป็นยีนที่ไม่ซ้ำกัน (Unigene) หรือยีนต่างชนิดกันถึง 4,662 ชนิด เมื่อทำการตรวจหาชนิดของยีนในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast ปรากฏว่าพบทุกยีน แต่ในจำนวนนี้ทราบชื่อยีนเพียง 2,489 ยีน อีก 2,173 ยีน ยังไม่ทราบชื่อ (unknown) อนึ่ง เมื่อต้นข้าวได้รับการกระตุ้นโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแล้วมียีนที่มีการแสดงมากขึ้น (up regulation) และแสดงออกลดลง (down regulation) 40 และ 16 ยีน ตามลำดับ ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับเรื่อง Stress เป็นส่วนใหญ่ และคาดว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลรวมอยู่ด้วย จึงนำข้อมูลของยีนเหล่านี้ไปออกแบบ primer และทดสอบยืนยันการแสดงออกอีกครั้ง และใช้เป็นข้อมูลในการโคลนยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สร้างเป็น cassette ของยีน สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

คำนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาจีโนม project ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด มีข้อมูลลำดับเบสของยีนสะสมเป็นจำนวนมาก แต่ยังขาดความเข้าใจในขบวนการทำงานของยีน จึงทำให้ไม่ทราบว่ายีนนั้นทำหน้าที่อะไร การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเชิงปริมาณและคุณภาพเป็นส่วนสำคัญของการศึกษาหน้าที่ของยีน การศึกษาการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณ และชนิดเป็นวิธีการที่ทำให้บรรลุเป้าหมายได้ วิธีการดั้งเดิมได้แก่ Northern blotting, RNA dot blotting และ RT-PCR methods สามารถศึกษายีนแต่ละครั้งได้จำกัด การจำแนกยีนที่มีการแสดงออกต่าง ๆ กันในตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง คัดเลือกต่างกัน

เทคนิค SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) พัฒนาขึ้นโดย Velculescu และคณะ (1995) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของยีนที่มีการแสดงออกภายในเซลล์ทั้งหมดที่มีความแม่นยำสูง เหมาะที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาการแสดงออกของยีนในยุค post genomic หลักการของเทคนิค SAGE โดยสังเขปคือ เปลี่ยนยีนที่มีการแสดงออกขณะนั้น หรือ mRNA ที่ไม่เสถียรให้เป็น cDNA (complementary DNA) ที่มีความคงตัวสูงมาก จากนั้นใช้เอนไซม์ *Nla* III ตัดสาย cDNA ส่วนที่อยู่ใกล้ปลาย 3’ ที่มี poly A ติดอยู่ จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วน

เชื่อมต่อกับ adaptor ที่มีจุดจดจำเพาะ หรือ restriction digestion site Type IIS จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ Type II อีกครั้ง เพื่อตัดส่วนที่เป็น poly A และบริเวณใกล้เคียงทิ้งไป นำ cDNA ที่ติดกับ linker 2 ส่วนนี้มาต่อกันเป็น ditag ขยายยีนส่วน ditag แล้วต่อ ditag ให้เป็นสายยาวเรียก concatenated tag นำส่วนนี้ไปต่อกับ plasmid vector แล้วอ่านลำดับพันธุกรรม ใช้โปรแกรมคำนวณแยกแต่ละ tag ออกมา จำนวนหรือความถี่ของ tag แต่ละชนิดที่พบแสดงถึงจำนวนยีน (mRNA) ที่พบในเนื้อเยื่อที่ศึกษา tag ประกอบด้วยลำดับเบส 9-10 bp ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละยีนที่มีการแสดงออก และเป็นข้อมูลที่เพียงพอ สามารถนำไปแยกสกัด (isolate) ยีนทั้งหมด (whole gene) ออกมาได้

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณและชนิดของยีนที่มีการแสดงออกทั้งจีโนมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์และค้นหายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว เพื่อการโคลนยีนมาใช้ประโยชน์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen life technology)
2. I-SAGE™ Kit (Invitrogen life technology)
3. SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology)
4. ElectroMAX™ DH10B™ Cells (Invitrogen life technology)
5. ชุดไปเปตขนาด 2 µl, 20 µl, 200 µl และ 1000 µl
6. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
7. เครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
9. เครื่องแยกสารพันธุกรรมในแนวนอน (GelMate 2000, TOYOBO)
10. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
11. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
12. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM® 3700 Genetic Analyzer)
13. เครื่องตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง (LightCycler , Roche)
14. พันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 90

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่างพืช

- ปลูกกล้าข้าว SPR 90 จำนวน 3 กระถาง กระถางละ 6 เมล็ด ให้มีอายุ 22 วัน จากนั้นนำต้นข้าวไปให้แมลงดูดกิน เพื่อกระตุ้นให้ยีนต้านทานมีการแสดงออกหรือตอบสนองดังนี้

กระถางที่ 1 เป็น control (ไม่ได้ให้แมลงดูดกิน)

กระถางที่ 2 ให้แมลงดูดกิน 1 วัน

กระถางที่ 3 ให้แมลงดูดกิน 2 วัน

ทำการตัดใบและต้นข้าว 100 กรัม ของทั้ง 3 กระถาง แช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บไว้ในตู้ -80°C จนกว่าจะทำการทดลอง

1. การเตรียม SAGE Libraries มีขั้นตอนใหญ่ ๆ 12 ขั้นตอน คือ

1.1 การสกัดแยก mRNA และสังเคราะห์ cDNA

- บดตัวอย่างข้าวจากตู้ -80°C ให้ละเอียด แยก Total RNA ด้วยน้ำยา Trizol (Gibco Life Technologies) ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ใน 1% agarose

1.2 แยก mRNA ออกจาก Total RNA 5 μg โดยใช้ Oligo (dT) beads (Dynal Oligo (dT) Magnetic Beads) จากนั้นเปลี่ยน mRNA ที่ติดอยู่กับ magnetic beads ให้เป็น first strand cDNA และเป็น double strand cDNA ตามลำดับ

1.3 ใช้เอนไซม์ *Nla* III (มีจุดจดจำสำหรับตัด CATG) ตัด cDNA ทางปลาย 3'

- จากนั้นแบ่ง cDNA ออกเป็น 2 หลอด นำมาต่อกับ Adaptor A และ B ตามลำดับ

1.4 ตัด cDNA ด้วยเอนไซม์ *Bs*FI ซึ่งเป็นเอนไซม์ TypeIIS ที่มีจุดตัดห่างจาก recognition site (อยู่บน adaptor) ไปอีก 13 -14 เบส เพื่อแยก tag (oligonucleotide ขนาด 10 - 14 เบส ที่เป็นตัวแทนของแต่ละยีน) ออกมา

1.5 ต่อเชื่อม tag ที่ติดกับ adaptor A และ B ให้ติดกันเรียก ditag

1.6 ขยายยีนบน 100 เบส ด้วย PCR ใช้เอนไซม์ *Nla* III ตัด แล้วแยก 26 bp ออกมาโดยใช้ 12% polyacrylamide

1.7 ทำการต่อ 26 เบส ditag เข้าด้วยกันเป็นสายยาวเรียก concatemers ตรวจสอบคุณภาพบน 8% polyacrylamide

1.8 สกัดแยก concatemers ออกจาก gel นำมาต่อกับ plasmid p2Ero^{r}-I (Invitrogen)

1.9 transform p2Ero^{r}-I ที่มีชิ้น concatemers เกาะอยู่ให้เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 electrocomp

1.10 คัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ที่มี concatemers ของ tag insert โดยการ plate ลงในอาหาร LB ที่มี 50 μg/ml ของสารปฏิชีวนะ Zeocin นำไปเลี้ยงที่ 37°C ข้ามคืน

1.11 ใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ย colony สีขาวที่ขึ้นใส่ใน 384 well-plate ที่มีอาหาร LB+Zeocin และ glycerol นำไปเลี้ยง 1 คืน

1.12 ใช้ copier replicate clone ต่างๆ ที่อยู่ใน 384 well-plate เลี้ยงในอาหารแข็ง LB+Zeocin เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน clone เหล่านี้พร้อมที่จะนำไปอ่านลำดับพันธุกรรม

2. การอ่านลำดับพันธุกรรมของโคลนใน SAGE Libraries

2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละโคลน นำไปแยก plasmid โดยใช้เทคนิค minipreb

2.2 ใช้ M13 forward และ reverse primer ในการทำ sequencing ด้วยเครื่อง ABI 3700

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ SAGE tags จากข้อมูลลำดับเบสที่อ่านได้แต่ละโคลน โดยใช้โปรแกรม SAGE2000 ซึ่งสามารถ download ได้จาก http://www.invitrogen.com/sage

3.1 เมื่อเข้าสู่โปรแกรม SAGE2000 แล้วให้ตั้งค่า Preferences ดังนี้

- Anchoring Enzyme เป็น *Nla*III
- Tag Length เป็น 10
- Ditag Length เป็น 24
- Tag Exclude List เป็น Select the tag exclude
- บันทึกค่า Preferences ที่ตั้งไว้

3.2 เข้าสู่เมนู Project แล้วเลือก New Project และบันทึกชื่อไฟล์ในโฟลเดอร์ที่ต้องการ หลังจากนั้นคลิกที่ Start โปรแกรมจะเริ่มประมวลผล ซึ่งพร้อมสำหรับใช้แยก Tags จากไฟล์ที่ได้จากการหาลำดับเบส

3.3 คัดลอกไฟล์ลำดับเบส (*.seq) เข้าเก็บในโฟลเดอร์ที่สร้างไว้ในข้อ 2

3.4 ไปที่โปรแกรม SAGE2000 ในเมนู Project เลือก Add Tags จะแสดงไฟล์ต่างๆ ในข้อ 3 ให้เห็นทั้งหมด

3.5 ให้คลิกเลือกไฟล์ที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วคลิกที่ Analyze หรือจะเลือกในตำแหน่ง Auto Analyze เพื่อวิเคราะห์ทุกไฟล์ที่มีในโฟลเดอร์ โดยโปรแกรมจะรายงานจำนวนไฟล์และจำนวน Tags วิเคราะห์ได้

3.6 ในกรณีที่มีหลายไลบรารี่ให้ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 2-5

การเปรียบเทียบลำดับของ Tags ระหว่างไลบรารี่ 1, 2 และ 3

- เข้าสู่โปรแกรม SAGE2000
- ในเมนู Project เลือก Project Manager จะปรากฏ ชื่อ Project ทั้งหมดที่มีอยู่ ให้คลิกเลือกหน้าชื่อ Project ที่ต้องการเปรียบเทียบกัน แล้วคลิก Open Projects
- ในเมนู Analyze เลือก Compare จะปรากฏชื่อ Project ที่เลือกไว้ แล้วคลิกปุ่ม Compareโปรแกรมจะให้บันทึกชื่อไฟล์ (*.MDB)
- โปรแกรมจะประมวลผล พร้อมทั้งสรุปละเอียดจำนวนและลำดับเบสของแต่ละ Tags ที่ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างไลบรารี่
- จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปค้นหาชนิดของยีนจากฐานข้อมูลที่ได้มีรายงานมาแล้วใน GenBank

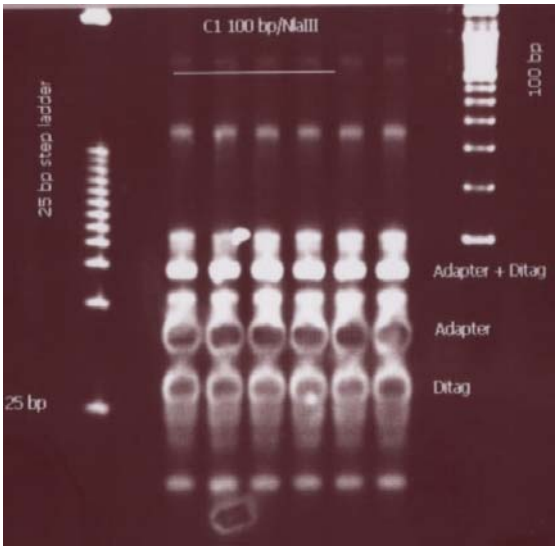
4. การโคลน candidate gene ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

นำลำดับ tag (10-14 base) ที่ได้จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบไลบรารี่ 1, 2 และ 3 ที่ยีนมีการแสดงออกเพิ่มเป็น primer คู่กับ oligo dT ในการขยายเพิ่มยีนในส่วนของปลาย 3' จากนั้นนำชิ้นยีนนี้ไปอ่านลำดับพันธุกรรม แล้วออกแบบ specific primer ใหม่ ให้มีทิศทางกลับไปยังปลาย 5' ของยีน ซึ่งเป็นส่วนที่ยีนเริ่มต้นทำงาน มี promoter อยู่

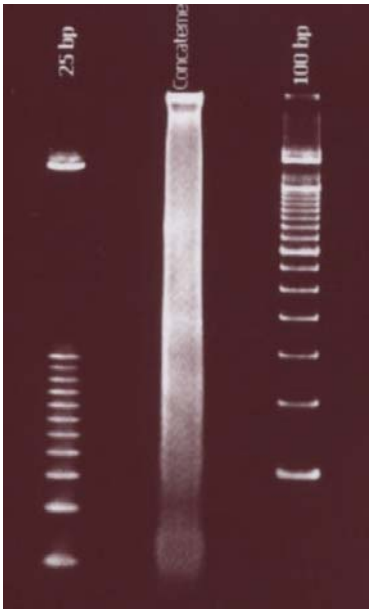
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียม SAGE Libraries

ทำการเตรียมไลบรารี่ ของ SAGE จำนวน 3 ไลบรารี่เพื่อนำไปหาลำดับพันธุกรรมใช้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการดูดกินหรือเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดย SAGE ไลบรารี่แรกเตรียมจากต้นข้าวที่ไม่ได้ถูกแมลงดูดกิน (control) สำหรับใช้เปรียบเทียบกับไลบรารี่ 2 และ 3 ที่ได้รับการดูดกินหรือกระตุ้นจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 1 และ 2 วัน ตามลำดับ การเตรียมไลบรารี่นี้ใช้วิธีการตาม I-SAGE kit ของ Invitrogen life technologies ทุกประการ การแยกสกัด ditag [tag เป็นลำดับของยีนสั้น ๆ ขนาด 9 -14 bp ที่มีลำดับ CATG ที่เป็นจุดจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ *Nla* III, ditag เป็นการเชื่อมต่อ 2 tag เข้าด้วยกันมีขนาดประมาณ 26 bp (แสดงในภาพที่ 1) ทำการตัดส่วนที่เป็น ditag มารวมกันแล้วผ่านขบวนการทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำ ditag แต่ละอันมาต่อกันให้เป็น concatemer ดังแสดงในภาพที่ 2 ได้ขนาดของ concatenated ditags ก่อนที่จะตัดต่อกับ plasmid ที่มีคุณภาพดี ขนาดเฉลี่ย 400-800 bp]



ภาพที่ 1 แสดงการแยก Ditag ออกจาก adaptor โดยใช้ 12% polyacrylamide gel



ภาพที่ 2 แสดงขนาดของ Ditag ที่เชื่อมต่อกันหลาย ๆ ชุด เป็น concatamer (lane กลาง) โดยใช้ 8% polyacrylamide gel

เมื่อตัดต่อเข้ากับ plasmid pZEro^{r}-I และ transform เข้า *E. coli* ได้โคลนของไลบรารี่ 1 (control) 2 และ 3 เก็บไว้ใน 384 well-plate ประมาณไลบรารี่ละ 1,000 โคลน สำหรับใช้อ่านลำดับสารพันธุกรรมและเก็บไว้ใน -80°C

2. การอ่านลำดับสารพันธุกรรมของโคลนใน SAGE Libraries

เมื่ออ่านลำดับพันธุกรรมของโคลนทั้งหมดใน SAGE Libraries ทั้งหมด แล้วนำไปวิเคราะห์ SAGE tag โดยใช้โปรแกรม SAGE2000 พบว่า ใน SAGE Libraries 1, 2 และ 3 มีการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณหรือ tag ทั้งหมด 13,624 ; 16,254 และ 10,404 tags ตามลำดับ ในจำนวน tag ที่พบเมื่อนำไปสืบค้นข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Blast search พบ tag ที่เป็นส่วนของยีนที่ไม่ซ้ำกัน 4,662 ยีน นอกจากนั้นเป็น tag หรือยีนที่ซ้ำ ๆ กัน และเป็น tag ที่ทราบชื่อเพียง 2,489 ยีน หรือคิดเป็น 53.39% ที่เหลือ 2,173 ยีน ยังไม่ทราบชื่อ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปผลการแสดงออกของยีนใน Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) Libraries 1, 2 และ 3 ที่ไม่ได้กระตุ้น (ไลบรารี่ 1 : control) กระตุ้นด้วยการให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดูดกิน 1 วัน (ไลบรารี่ 2) และ 2 วัน (ไลบรารี่ 2) ตามลำดับ

ไลบรารี่	จำนวน tag ที่พบทั้งหมด	จำนวน tag ที่ต่างกันหรือ unigene	จำนวน tag ที่พบมากกว่า 1 copy	จำนวนยีนที่ตรวจพบ (matched) ในฐานข้อมูล
1 (control)	13,624	4,662	8,962	2,489 (53.39%) known gene
2 (1 วัน)	16,254	4,662	11,592	
3 (2 วัน)	10,404	4,662	5,742	2,173 (46.61%) unknown gene

ผลการอ่านลำดับเบสและวิเคราะห์ยีนนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Matsumura และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาการแสดงออกของยีนจากใบข้าว Japonica ที่มีอายุ 5 วัน พบ unigene ที่แตกต่างกันถึง 5,921 ยีน ในจำนวนนี้มีเพียง 1,367 ยีน หรือ 23.10% ที่ตรงกัน (matched) กับ cDNA ในฐานข้อมูล ที่เหลือไม่พบในฐานข้อมูล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นยีนใหม่ที่ยังไม่ทราบชื่อและหน้าที่ ถึงแม้ว่าจะมีโครงการถอดรหัสพันธุกรรมข้าวสำเร็จแล้วก็ตาม ซึ่งเป็นการถอดรหัสดีเอ็นเอทั้งจีโนม ที่เป็นเสมือนพิมพ์เขียวของชีวิต แต่ยีนที่ศึกษาครั้งนี้เป็น cDNA หรือเป็นยีนที่มีการแสดงออกที่จะมีความแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ ระยะเวลาที่เจริญเติบโต หรือในสิ่งแวดล้อมต่างไป ซึ่งทั้งหมดเกิดจากการถอดรหัส (transcription) มาจาก DNA แม่แบบไปเป็น mRNA นั่นเอง จาก mRNA จะเป็นแม่แบบในการสร้างโปรตีน (translation) ที่เป็นผลิตผลจากยีน

จากการทดลองนี้ยังสามารถตรวจพบยีนที่มีการแสดงออกมากในข้าว ซึ่ง ตารางที่ 2 เป็นการสรุปยีน 47 ยีน ที่ตรวจพบการแสดงออกมากกว่า 100 copy โดยทั้งหมดนี้เมื่อค้นหาโดยโปรแกรม Blast พบเป็น mRNA sequence ทั้งหมด แต่ทราบชื่อเพียง 25 tag (53%) ที่เหลือ 22 tag พบตรงกัน (match)กับลำดับของ mRNA ในฐานข้อมูลแต่ไม่ทราบชื่อยีน

ตารางที่ 2 สรุป Tag หรือยีนที่มีการแสดงออกมากกว่า 100 copy ในกล้าข้าวที่มีอายุ 22 วัน

No.	Tag No.	Tag sequence	Number of tag	Percentage	Blast	Corresponding gene
1	1	ACAAGTTTTT	1100.00	2.92	mRNA sequence	transcribed sequence
2	2	GATCGATTTG	601.00	1.59	mRNA sequence	-
3	7	GACCGTCTAC	499.00	1.32	Leaf was dried for 2hr	-
4	9	TAATATGATG	499.00	1.32	reverse transcribed	putative glucosyl transferase
5	5	ATGATGATAT	381.00	1.01	mRNA sequence	ไม่มีชื่อ gene
6	4	GTAGCAGCAG	333.00	0.88	mRNA sequence	ไม่มีชื่อ gene
7	6	GGGGATTGTG	326.00	0.86	mRNA sequence	-
8	10	TAAATTGTGC	300.00	0.80	mRNA sequence	RNA recognition motif
9	12	CCCAGCTATG	300.00	0.80	mRNA sequence	-
10	15	GAAGAACTAT	256.00	0.68	mRNA sequence	-
11	13	TATGTATGTA	231.00	0.61	mRNA sequence	expressed protein
12	16	TTCGGATGCA	216.00	0.57	mRNA sequence	-
13	14	TGGAGTTGTG	212.00	0.56	inoculated leaves	ไม่มีชื่อ gene
14	24	TTCGGCTGCA	205.00	0.54	mRNA sequence	ribulosebisphosphate
15	8	GAGAGAGGGA	201.00	0.53	mRNA sequence	A.thaliana_ expressed protein
16	11	GTGGTGATTT	198.00	0.52	mRNA sequence	-
17	19	GAGGAATGGA	190.00	0.50	mRNA sequence	photosystem I,putative
18	22	CTTGTGATTC	190.00	0.50	mRNA sequence	-
19	20	AATCTTTTCT	187.00	0.50	mRNA sequence	-
20	47	GTAGATTGAT	179.00	0.47	Uninfected Control	-
21	17	GATGGCATCG	168.00	0.45	mRNA sequence	ไม่มีชื่อ gene
22	23	ACGAAAGTTT	168.00	0.45	mRNA sequence	-
23	39	TTGCTTGGGA	168.00	0.45	14 d after germination	ไม่มีชื่อยีน
24	28	TTGATATTGT	165.00	0.44	mRNA sequence	-
25	37	GCGGAATAAC	161.00	0.43	mRNA sequence	-
26	25	ATGCGTATGT	157.00	0.42	overexpressing transgenic	-

ตารางที่ 2 สรุป Tag หรือยีนที่มีการแสดงออกมากกว่า 100 copy ในกล้าข้าวที่มีอายุ 22 วัน (ต่อ)

No.	Tag No.	Tag sequence	Number of tag	Percentage	Blast	Corresponding gene
27	45	AGTATATTTC	157.00	0.42	14 days after germination	shepherd protein,putative
28	44	CATAATTGAA	154.00	0.41	14 days after germination	-
29	21	TTCGGCTTCT	146.00	0.39	mRNA sequence	mRNA, 3' untranslated region
30	34	TGCAGTAACA	146.00	0.39	mRNA sequence	ไม่มีชื่อ gene
31	29	CAAGGATTGA	139.00	0.37	mRNA sequence	-
32	30	GAAAGAAAAA	139.00	0.37	24 hrs after innoculation	Transcribed sequence ; zeaxanthin epoxidase
33	33	CATATGTGAA	135.00	0.36	mRNA sequence	-
34	55	CGTTCTTGAG	128.00	0.34	mRNA sequence	F-box protein family
35	27	TCGGACAAGT	124.00	0.33	mRNA sequence	Expressed protein
36	48	AGGATGCTCC	124.00	0.33	mRNA sequence	ไม่มีชื่อ gene
37	31	GCGACGCATC	117.00	0.31	mRNA sequence	-
38	52	TATCAATGTA	117.00	0.31	Drought Stress Panicle	-
39	32	GTCTCGATCT	113.00	0.30	mRNA sequence	ไม่มีชื่อ gene
40	63	AGCTCCTTAA	110.00	0.29	mRNA sequence	cerebellin precursor-like 1;translationally controlled
41	86	TATTTGAAAG	110.00	0.29	14 days after germination	ETAA16 ETAA16 protein
42	107	GAGAAAATTA	110.00	0.29	mRNA sequence	FZD 8 frizzled homolg 8
43	18	TAACAGCGAG	102.00	0.27	Uninfected Control	-
44	26	GTTGATCGGC	102.00	0.27	mRNA sequence	putative nonspecific
45	36	CCTTGTTGAT	102.00	0.27	mRNA sequence	-
46	49	AATTGAGTTC	102.00	0.27	mRNA sequence	-
47	56	TAAGTGGCAG	102.00	0.27	mRNA sequence	leucine zipper-containing

3. ผลการแสดงออกของยีนเนื่องจากถูกกระตุ้นด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของ tag ทั้ง 3 ไลบรารี่ พบว่า ในไลบรารี่ 2 และ 3 ที่ถูกกระตุ้นโดยการให้แมลงดูดกิน 1 และ 2 วัน มี Tag จำนวนหนึ่งที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง (up and down regulated transcription) จำนวน 40 และ 16 ยีน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ยีนเหล่านี้คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หรืออาจเรียกว่าเป็น candidate gene ที่จะนำมาโคลนและทดสอบต่อ ตัวอย่างเช่น Tag 3 ในไลบรารี่ 2 และ 3 เมื่อถูกกระตุ้นโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เป็น 729 และ 985 จากเดิมในไลบรารี่ 1 มีเพียงที่มีเพียง 47 copy เมื่อสืบค้น (Blast search) ในฐานข้อมูลของยีนพบว่า Taq 3 เป็นยีน Mitogen-activated protein kinase และ Tag 61 มีการแสดงออกของยีนในสภาพปกติ 22 copy เมื่อถูกกระตุ้นโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 1 และ 2 วัน จำนวนยีนเพิ่มขึ้นเป็น 89 และ 120 copy ตามลำดับ เมื่อสืบค้นในฐานข้อมูลพบว่าเป็น Hypothecal protein หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาพขาดน้ำ

4. การโคลน candidate gene ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ได้ทำการโคลน Taq 61 (hypothetical protein) ออกมาแล้ว รอที่จะทำการตัดต่อเข้ากับพาหะที่เป็น plasmid (plasmid construction) สำหรับใช้ถ่ายยีนหรือทดสอบการแสดงออกต่อไป สำหรับการโคลน Taq อื่นๆกำลังดำเนินการอยู่

ตารางที่ 3 แสดง Tag หรือยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Tag No.	Seq	%c	%d1	%d2	Sage/Gene
Tag3	CCTACTGTCC	47	729	985	H_Mitogen-activated protein kinase
Tag61	CCTTTGCTGC	22	89	120	H_hypothetical protein, cDNA from drought stress
Tag74	TGTAAATACT	11	76	100	Dormancy associated protein, T_putative, T_transcribed seq
Tag35	TGTTCGTCCT	80	116	129	H_glutamate receptor
Tag99	AAGGCTGCGG	33	98	16	H_eukaryotic translation
Tag246	TATGTCCGTC	7	15	43	Na^+ phosphate transporter
Tag132	CTGGCTTTTG	18	27	67	Cellular structures gene: nuclear envelop epidermal cell
Tag273	CATCAACTGT	7	24	28	H_hypothetical protein, T_pollen
Tag256	GGGAATGAGA	11	18	33	H_glutathione; peroxidase (H)
Tag100	CTGCTGGATG	29	43	46	H_chromosome
Tag54	GTTCAGTGCT	44	89	120	H_ubiquinol; cytochrome C (H)
Tag573	GATGGCAATG	0	9	24	Hypothetical protein
Tag267	TTTTCCTTGT	0	18	43	H_Cyclophilin A (PPIA peptidylprolyl isomerase A)
Tag38	GCGGCAAAGC	88	107	124	T_nodulin MtN3 family protein, Treat with NaCl, drought
Tag167	CTGTTGGATT	18	24	48	Jusmonate carboxyl methyltransferase overexpression
Tag582	TTCAATGCCG	3	6	24	Transcription up-regulated by salt stress, Anoxia
Tag445	GCTTGAGATT	3	36	0	H_no name
Tag400	GAGGATCAAT	0	9	33	H_no name
Tag397	AGGGGGGATA	3	6	33	H_no name
Tag143	CATCAATAAA	7	27	72	H_no name
Tag370	TACATAGACA	3	9	33	No match
Tag134	CAATCCCCCC	18	36	57	No match
Tag104	GTACATACTA	33	76	33	No match
Tag328	AAGTGCGTAC	3	33	14	No match
Tag93	TACGTGCATT	18	95	48	No match
Tag42	CATCTTGTCT	51	132	120	No match

ตารางที่ 4 แสดง Tag หรือยีนที่มีการแสดงออกลดลงหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Tag No.	Tag_Sequence	Project _1	Project _2	Project _3	Project _total		
37	GCGGAATAAC	161	86.00	72.00	319.00	0.28	No match
39	TTGCTTGGGA	168	73.00	72.00	313.00	0.28	No match
44	CATAATTGAA	154	83.00	52.00	289.00	0.25	No match
45	AGTATATTTC	157	55.00	76.00	288.00	0.25	Ta.28735 Transcribed locus, strongly similar to NP_194150.1 shepherd protein (SHD) / clavata formation protein, putative [Arabidopsis thaliana]
48	AGGATGCTCC	124	55.00	96.00	275.00	0.24	At.11015 Dehydration-responsive family protein
49	AATTGAGTTC	102	70.00	100.00	272.00	0.24	At.27314 ADP-glucose pyrophosphorylase family protein
52	TATCAATGTA	117	61.00	81.00	259.00	0.23	
56	TAAGTGGCAG	102	83.00	62.00	247.00	0.22	Ta.1395 Transcribed locus, strongly similar to XP_475281.1 unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
63	AGCTCCTTAA	110	43.00	76.00	229.00	0.20	Ta.15455 Transcribed locus, weakly similar to NP_188286.1 translationally controlled tumor family protein [Arabidopsis thaliana]
64	GCAGTTGGCC	101	36.00	48.00	179.00	0.16	
86	TATTTGAAAG	110	18.00	38.00	166.00	0.15	At.27385 Expressed protein
118	CAGTATGCTG	51	21.00	48.00	120.00	0.11	Ta.4729 Transcribed locus, strongly similar to XP_482574.1 putative polypyrimidine tract-binding protein homolog [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
160	TAGCATCGTG	40	21.00	33.00	94.00	0.08	No match
182	GAATAAAAAT	36	21.00	24.00	81.00	0.07	No match
207	GGGAATTATA	44	21.00	9.00	74.00	0.07	No match
233	TATGCAGGTG	44	21.00	4.00	69.00	0.06	No match

สรุปผลการดำเนินงาน

1. ได้ทำ SAGE libraries 3 library เก็บๆไว้โคลนในตู้ -80° C สำหรับใช้ต่อไป

2. จากการอ่านลำดับเบส และวิเคราะห์ข้อมูลของ SAGE libraries พบยีนที่ไม่ซ้ำกัน 4,662 ยีน เป็นจำนวนนี้ 53 % ที่ทราบชื่อเท่านั้น

3. ได้ทำการอ่านลำดับพันธุกรรมและเปรียบเทียบไลบรารี่ทั้ง 3 พบว่าเมื่อต้นข้าวได้รับการกระตุ้นด้วยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มียีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลง 40 และ 16 ยีน ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าเป็น candidate gene ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน

4. ได้วิธีการที่ได้ Tag ขนาดสั้นๆ หาลำดับชิ้นของยีนก่อนแล้วเปลี่ยนเป็น specific primer ที่มีความยาวมากขึ้นในการโคลนยีนให้เต็มยีนได้

5. ได้โคลนยีนจาก Tag 61 สำเร็จเพื่อรอทดสอบต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Datta S.K., L.B. Torrizo, J.Tu, N.p.Oliva and K.DaHa. 1997. Production and molecular evaluation of transgenic rice plants. IRRI Discussion paper series No.21.

James. C, and A.F. Kraltiger, 1996. Global Review of Field Testing and Commercializtion of Transgenic Plant : 1986 - 1995 The First Decade of Crop Biotechnology. ISAAA.NY.BIP

Lavery, D.J.,L.L. Molina, F.F. Olela, and U.Schibler. 1997. Selective amplification via biotin-and restriction-mediated Enrichment, a novel selective amplification procedure for detection of differentially expressed mRNAs

Liang P., L.Averboukh, K.Keyomarsi, R. Sager, and A.B.Pardes. 1992. Differential Display and cloning of Messenger RNAS from Human Breast Cancer versus Mammary Epithelial Cell. Caner Research 52:6966-6968.

Xu, Y., W.G. Buchholz, R.T. Derose and T.C. Hall. 1995. Characterization of rice gene family encoding root-specific proteins. Plant Molecular Biology 27 : 237-248.